

IB/05/506

# Ministero delle Attività Produttive

*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*

*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*

*Ufficio G2*



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000347**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Inoltre Istanza di Correzione (pagg. 10) e Allegato (pag. 10) depositata alla CCIAA di Milano il 01.12.2004 prot. MIV3461, inoltre: istanza di Correzione (pagg. 2) e disegni definitivi (pagg. 3) positati all'UIBM il 24.02.2005 prot. 10295.

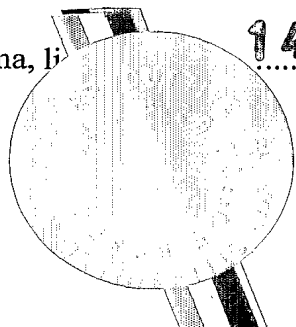
**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li

14 APR. 2005

IL FUNZIONARIO

*Pelle Galloppo*  
Pelle Galloppo



537PTIT

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

MI 2004 A 00034

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°



## A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	PHARMA MEDICAL LIMITED		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4	LONDRA / GB		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
<b>A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO</b>	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
<b>C. TITOLO</b>	C1	NUOVO FARMACO DA ASSOCIAZIONE		

## D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	PIETRANGELO ANTONELLO
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	TRAVAGLI WALTER
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

## E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5
	A61K	31		

## F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
<b>G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI</b>	G1				
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	DR. DIEGO PALLINI				

**I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM**

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	<b>I1</b>	<b>N. 484</b> <b>DIEGO PALLINI</b>
DENOMINAZIONE STUDIO	<b>I2</b>	<b>NOTARBARTOLO &amp; GERVASI S.P.A.</b>
INDIRIZZO	<b>I3</b>	<b>C.SO DI PORTA VITTORIA 9</b>
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	<b>I4</b>	<b>20122 MILANO</b>
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	<b>L1</b>	

**M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE**

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 1 ESEMPLARI)	<b>1</b>		<b>15</b>
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 1 ESEMPLARI)	<b>0</b>		<b>0</b>
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	<b>0</b>		
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO	<b>0</b>		
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	<b>0</b>		

(SI/NO)

LETTERA D'INCARICO	<b>SI</b>
PROCURA GENERALE	<b>NO</b>
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	<b>NO</b>

(LIRE/EURO)

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

EURO	<b>CENTOOTTANTOTTO/51.=</b>				
<b>A</b>		<b>D</b>		<b>F</b>	
<b>SI</b>					
<b>NO</b>					

ATTESTATI DI VERSAMENTO

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI  
PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)  
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA  
AUTENTICA? (SI/NO)

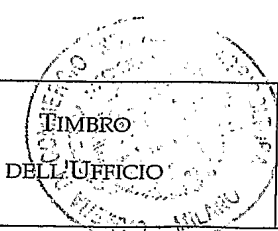
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ  
AL PUBBLICO? (SI/NO)

DATA DI COMPILAZIONE **26 FEBBRAIO 2004**

FIRMA DEL/DEI  
RICHIEDENTE/I

**DR. DIEGO PALLINI**

**VERBALE DI DEPOSITO**

NUMERO DI DOMANDA	<b>MI 2004 A 000347</b>		
C.C.I.A.A. DI	<b>MILANO</b>		COD. <b>15</b>
IN DATA	<b>26/02/2004</b>	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME	
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.	<b>00</b>	FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE			L'UFFICIALE ROGANTE
<i>Gi. Lo. Aut.</i>			<i>Rosa. Boglio</i>

537PTIT

**PROSPETTO MODULO A**  
**DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE**

NUMERO DI DOMANDA:

MI 2004 A 0 0 0 3 4 7

DATA DI DEPOSITO:

26 Febbraio 2004

**A. RICHIEDENTE/I** COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO**PHARMA MEDICAL LIMITED****LONDRA / GB****C. TITOLO****NUOVO FARMACO DA ASSOCIAZIONE**

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

**E. CLASSE PROPOSTA**

A61K

31

**O. RIASSUNTO**

La presente invenzione si riferisce ad esteri della reina o di suoi derivati con l'acido ialuronico, in forma nativa o derivata, in cui la reina esterifica parzialmente o totalmente i gruppi alcolici dell'acido ialuronico, ad un procedimento per la loro preparazione e a composizioni farmaceutiche comprendenti tali esteri.

**P. DISEGNO PRINCIPALE**

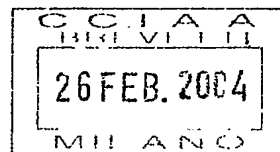
FIRMA DEL/DEI

RICHIEDENTE/I

**DR. DIEGO PALLINI**

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo :

"Nuovo farmaco da associazione"



A nome di: PHARMA MEDICAL LIMITED

MI 2004 A 0 0 0 3 4.7

con sede in: LONDRA / GB

Inventori designati: PIETRANGELO Antonello, TRAVAGLI Walter

Depositata il: con il n°

\* \* \* \* \*

### CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda esteri dell'acido ialuronico con la reina, un procedimento per la loro preparazione ed una composizione farmaceutica comprendente tali esteri.

### STATO DELL'ARTE

La reina è un alcaloide derivato dalla Senna che possiede proprietà antiinfiammatoria e protettiva dei tessuti. Questa sostanza viene somministrata per via orale, di solito come diacetilreina, derivato che possiede una più elevata biodisponibilità e trova la sua principale applicazione nella terapia delle infiammazioni articolari. Entrambe la reina e la diacetilreina presentano tuttavia l'inconveniente di avere una notevole azione lassativa, che può portare fino alla diarrea e che ne rende sconsigliato l'utilizzo da parte di pazienti anziani o debilitati. Inoltre, a causa dell'insolubilità in acqua di reina e diacetilreina, non è possibile ovviare a questo effetto collaterale somministrando tali principi attivi per via parenterale o intraarticolare.

L'acido ialuronico è un mucopolisaccaride naturale formato da unità alternate di acido D-glucoronico e N-acetilglucosamina, presente in tutti i

tessuti molli dell'organismo e in molti fluidi fisiologici come, ad esempio, il liquido sinoviale delle articolazioni e l'umor vitreo dell'occhio. L'acido ialuronico trova numerose applicazioni cliniche. In particolare, viene utilizzato con successo nelle infiammazioni articolari dove è somministrato per infiltrazione direttamente nell'articolazione e agisce tramite un duplice meccanismo: da un lato diminuendo l'infiammazione articolare e dall'altro aumentando la viscosità del liquido sinoviale recando pertanto beneficio alla cartilagine che risulta più lubrificata. Inoltre, trova applicazione in oftalmologia, dove viene utilizzato per le sue proprietà protettive ed antiinfiammatorie, e nella riparazione tissutale, grazie alla sua azione ricostruttiva-anabolica sulla cartilagine e sulla pelle.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

I presenti inventori hanno ora trovato che esteri ialuronil-reinati in cui la reina esterifica parzialmente o totalmente i gruppi alcolici dell'acido ialuronico presentano una stabilità elevata ed un'attività farmacologica sorprendentemente migliorata rispetto a quella osservata per i due principi attivi utilizzati separatamente.

Inoltre, tali esteri possono essere utilizzati per somministrazione locale, evitando pertanto gli inconvenienti legati alla somministrazione orale di reina.

Pertanto la presente invenzione si riferisce a esteri ialuronil-reinati in cui la reina, come tale o derivata, esterifica parzialmente o totalmente i gruppi alcolici dell'acido ialuronico, in forma nativa o derivata, ad un procedimento per la loro preparazione e a composizioni farmaceutiche comprendenti tali esteri.

## DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE:

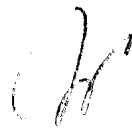
Oggetto della presente invenzione è un estere ialuronil-reinato in cui la reina, come tale o in forma derivata, esterifica parzialmente o totalmente i gruppi alcolici dell'acido ialuronico.

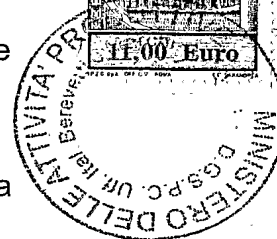
Oggetto della presente invenzione sono anche i sali farmaceuticamente accettabili del suddetto estere, tra cui particolarmente preferito è il sale sodico.

Per forma derivata della reina secondo la presente invenzione si intende qualsiasi derivato della reina farmacologicamente attivo *in vivo* e in cui il gruppo acido della reina sia disponibile per la formazione del legame estereo con gli idrossili dell'acido ialuronico. Preferiti sono derivati della reina che rendono disponibile *in vivo* tale antrachinone. Tra questi derivati della reina particolarmente preferita è la diacetilreina.

Preferibilmente la reina esterifica almeno il 5% dei gruppi alcolici dell'acido ialuronico, più preferibilmente tra il 5 e il 50%, ancor più preferibilmente tra il 5 e il 20%. Particolarmente preferito è un estere in cui la reina esterifica il 10% dei gruppi alcolici della reina

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è un procedimento per la preparazione dei suddetti esteri ialuronil-reinati comprendente la reazione del cloruro acido della reina con l'acido ialuronico preferibilmente in quantità tali da ottenere un rapporto percentuale tra le mmol di cloruro acido della reina ed i meq delle unità alcoliche esterificabili dell'acido ialuronico superiore al 5%, più preferibilmente compreso tra 5% e 50%, ancor più preferibilmente tra il 5% e il 20% e secondo una realizzazione particolarmente preferita del 10%.





Preferibilmente, il suddetto procedimento comprende i seguenti stadi:

- a) si prepara una sospensione di acido ialuronico in un solvente apolare aprotico, preferibilmente cicloesano;
- b) si aggiungono il cloruro acido della reina disciolto nella minima quantità di un solvente apolare aprotico e un accettore di ioni idrogeno, preferibilmente  $\text{Et}_3\text{N}$ ;
- c) si lascia sotto agitazione a riflusso per un tempo sufficiente allo svolgersi della reazione di esterificazione, preferibilmente per almeno 20 ore; e
- d) si evapora il solvente.

Il cloruro acido della reina utilizzato nella suddetta reazione è preferibilmente ottenuto attraverso un procedimento comprendente i seguenti stadi:

- a') si prepara una sospensione di reina in un solvente apolare aprotico, preferibilmente un solvente clorurato e ancora più preferibilmente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ;
- b') si aggiunge una quantità di  $\text{SOCl}_2$  tale da ottenere un rapporto molare tra  $\text{SOCl}_2$  e reina superiore a 10;
- c') si lascia la reazione sotto agitazione a riflusso in atmosfera inerte per un tempo sufficiente alla formazione del cloruro acido della reina, preferibilmente per almeno tre ore; e
- d') si allontanano il solvente e l'eccesso di  $\text{SOCl}_2$  non reagito per distillazione.

Secondo un'applicazione particolarmente preferita l'estere ialuronil-reinato ottenuto con il procedimento sopra descritto viene purificato.



Preferibilmente tale purificazione viene eseguita tramite l'utilizzo di una membrana da dialisi. In questo caso, come verrà descritto negli esempi che seguono, viene utilizzata preferibilmente la membrana da dialisi presente in commercio con il marchio "Slide-A-Lyzer 3.5K" (Pierce, Rockford, IL U.S.A.), seguendo le istruzioni del produttore.

L'estere ialuronilreinato della presente invenzione presenta proprietà antiinfiammatorie, pro-cicatizzanti, ricostruttiva, anabolica della pelle e della cartilagine.

Pertanto, la presente invenzione si riferisce inoltre a composizioni farmaceutiche, comprendenti il suddetto estere ialuronil-reinato in associazione con adatti eccipienti e/o diluenti. Preferibilmente tali composizioni hanno una formulazione adatta alla somministrazione loco-regionale.

Tra le suddette composizioni particolarmente preferite sono quelle adatte all'uso per infiltrazione intraarticolare, per somministrazione oftalmica, ad esempio colliri e pomate oftalmiche, e per somministrazione topica.

Oggetto della presente invenzione è anche l'uso del suddetto estere ialuronil-reinato per la preparazione di un medicamento per la terapia di patologie infiammatorie, tra cui preferibilmente patologie infiammatorie delle articolazioni, in particolare artrosi ed artrite reumatoide.

La presente invenzione si riferisce anche all'uso del suddetto estere ialuronil-reinato per la preparazione di un medicamento per la riparazione tissutale, in cui detto tessuto è cartilagine o pelle.

Inoltre, l'estere della presente invenzione può essere utilizzato per la preparazione di biomateriali, ad esempio garze per la medicazione di

ferite o ustioni e matrici per la crescita cellulare da utilizzarsi nella terapia di ustioni e in implantologia.

La presente invenzione verrà meglio illustrata dagli esempi sperimentali che seguono.

#### Esempio 1

##### *Preparazione del cloruro acido della reina*

In un pallone da 50 ml con collo a smeriglio si pongono 21.5 mg di reina (corrispondenti a 0.075 mmol). Si aggiungono 15 ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La sospensione assume una colorazione arancione.

Si aggiungono 0.5 ml di  $\text{SOCl}_2$  (corrispondenti a 6.9 mmol).

La reazione viene messa sotto agitazione a riflusso ( $50^\circ\text{C}$ ) in atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ). Si lascia la reazione a riflusso per 3 ore: la soluzione assume una colorazione arancione-giallo limpida.

Per allontanare il  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e l'eccesso di  $\text{SOCl}_2$  non reagito si aggiungono circa 5 ml di toluene e si distilla a 500 mmHg, corrispondenti a  $6.6 \cdot 10^4$  Pa, per almeno 4 volte.

#### Esempio 2

##### *Preparazione di ialuronil-reinato*

277.3 mg di acido ialuronico (Peso molecolare medio circa  $600.000 \text{ Da}^1$ ) (corrispondenti a 0.75 meq di unità alcoliche esterificabili) sono sospesi in 20 ml di cicloesano.

Si aggiungono 0.075 mmol di cloruro acido di reina solubilizzato nella minima quantità di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Si aggiungono 3 ml di  $\text{Et}_3\text{N}$ . La sospensione assume una colorazione rossa.

Si mette la reazione sotto agitazione a riflusso ( $70^\circ\text{C}$ ) in atmosfera inerte

(N<sub>2</sub>). Dopo poco tempo la sospensione assume una colorazione rosso-arancione che tende ad imbrunire dopo circa tre ore. Dopo 20 ore si interrompe la reazione e si evapora il solvente a pressione ridotta (650 mmHg, corrispondenti a  $8.7 \cdot 10^4$  Pa) fino a secchezza, ottenendo un precipitato giallo chiaro.

### ESEMPIO 3

#### *Purificazione del prodotto*

##### a) preparazione del campione

A 0.1019 g di ialuronil-reinato ottenuto come descritto nell'esempio 2 si aggiungono 5 ml di tampone fosfato soluzione salina a pH 7.4. Si ottiene un sistema bifasico: la soluzione assume una colorazione arancione-gialla, mentre il residuo è rappresentato da una massa di colore giallo-marrone di consistenza gelatinosa.

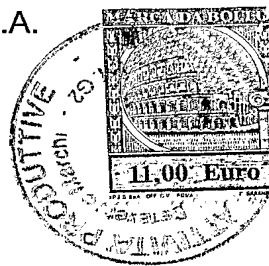
Si aspetta per almeno 24 ore fino ad ottenimento di un sistema colloidale viscoso di colorazione marrone.

##### b) purificazione

Si lascia idratare opportunamente con tampone fosfato soluzione salina a pH 7.4 la membrana da dialisi "Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> 3.5K" (Pierce, Rockford, IL USA). Si introduce secondo la metodica prevista dal produttore una adeguata quantità di prodotto da purificare. Si dializza per 2 ore contro tampone fosfato a pH 7.4 (già dopo 20 minuti la soluzione tampone appare leggermente colorata di giallo). Si ripete l'operazione per almeno tre volte, fino a che la soluzione tampone rimane incolore, controllando l'assenza di assorbimento nello spettro del visibile.

Si recupera il composto purificato dalla membrana per dialisi.





## ESEMPIO 4

*Analisi del prodotto ottenuto*

## 1) Controllo con spettrofotometro UV-VIS

E' stata valutata la concentrazione di reina nel prodotto finale ottenuto come descritto nell'esempio 3 tramite lettura spettrofotometrica a 430 nm in base alla retta di taratura "robusta" nel range  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  ( $R^2=0.9999$ ). E' stata scelta questa lunghezza d'onda in quanto l'acido ialuronico assorbe nel range UV rendendo pertanto difficile la determinazione quantitativa dell'antrachinone.

In base alla lettura spettrofotometrica la resa della reazione di esterificazione è risultata essere leggermente superiore al 50% e il rapporto percentuale tra le mmol di cloruro acido della reina ed i meq delle unità alcoliche esterificabili dell'acido ialuronico è risultato superiore al 5%, come indicato nella descrizione sopra riportata..

2) Analisi  $^1\text{H-NMR}$ 

E' stato eseguito uno spettro  $^1\text{H-NMR}$  del prodotto ottenuto nell'Esempio 2 in soluzione tampone deuterata utilizzando uno spettrometro Varian VRX300. Tuttavia, si sono riscontrati problemi nell'interpretazione di questo spettro in quanto la percentuale di reina che reagisce con l'acido ialuronico non ha permesso l'identificazione dell'anello aromatico.

Tenendo presente la scarsa solubilità della reina in ambiente acquoso e considerando che l'esterificazione è una reazione reversibile si è quindi eseguita una saponificazione in modo da ottenere la reina dall'estere ialuronil-reinato. Il composto ottenuto è stato precipitato. E' stato eseguito uno spettro  $^1\text{H-NMR}$  del prodotto, così ottenuto, in

dimetilsolfossido (DMSO) utilizzando lo spettrometro Varian VRX300. Lo spettro ottenuto, mostrato in Figura 1, era del tutto coincidente con quello della reina.

### 3) I.R.

E' stato eseguito uno spettro I.R. in Nujol del composto ottenuto dalla saponificazione dell'estere ialuronil-reinato (tramite apparecchiatura Spectrum BX FT-IR System, Perkin Elmer). Come mostrato nella Figura 2 lo spettro ottenuto è coincidente con quello della reina pura.

### 4) HPLC-MS

E' stata eseguita una analisi HPLC-MS (tramite apparecchiatura Agilent 1100, serie LC/MSD) del composto ottenuto dalla saponificazione dell'estere ialuronil-reinato, utilizzando come fase mobile una miscela metanolo acqua 80:20 contenente il 2.5% di acido formico, ad un flusso di 0.8 ml/min. Come si può vedere dalla Figura 3, la massa del composto è concordante con quella della reina.

## ESEMPIO 5

### *Valutazione della stabilità del prodotto*

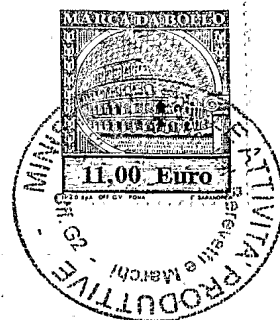
L'estere ialuronil-reinato prodotto come descritto nell'Esempio 2 e non purificato mediante dialisi è stato conservato per più di sei mesi allo stato secco in vials al buio ed a temperatura ambiente ( 22°C). Tale campione è stato successivamente purificato mediante dialisi come descritto nell'Esempio 3 e la concentrazione di reina è stata valutata mediante spettrofotometro UV-VIS. La concentrazione è risultata uguale a quella ottenuta per il prodotto sintetizzato al momento. I risultati sperimentali permettono quindi di affermare che non è stata evidenziata alcuna

degradazione.

L'estere ialuronil-reinato prodotto come descritto nell'Esempio 2 e purificato mediante dialisi come descritto nell'Esempio 3 è stato invece conservato per sei mesi in una soluzione al 2% in tampone fosfato pH 7.4 in vials al buio, ad una temperatura di 4°C. Nel campione è stata rilevata la presenza di corpi estranei, dovuti all'utilizzo di materiale non sterile e al mancato impiego di conservanti. Il campione è stato di nuovo posto a dializzare con la stessa metodica proposta nell'Esempio 3, sottoponendo a dialisi per almeno quattro giorni: non è stato possibile evidenziare mediante controllo UV-VIS reina rilasciata nelle varie soluzioni tampone impiegate per la dialisi. Anche in questo caso quindi il composto si è dimostrato chimicamente stabile in quanto non si è riscontrato rilascio di reina dall'estere, almeno in termini evidenziabili analiticamente.

## RIVENDICAZIONI

1. Estere ialuronil-reinato in cui la reina, come tale o in forma derivata, esterifica parzialmente o totalmente i gruppi alcolici dell'acido ialuronico e suoi sali farmaceuticamente accettabili.
2. Estere secondo la rivendicazione 1 in cui la reina esterifica almeno il 5% dei gruppi alcolici dell'acido ialuronico.
3. Estere secondo la rivendicazione 2 in cui la reina esterifica tra il 5% il 50% dei gruppi alcolici dell'acido ialuronico.
4. Estere secondo la rivendicazione 3 in cui la reina esterifica tra il 5% il 20% dei gruppi alcolici dell'acido ialuronico
5. Estere secondo la rivendicazione 4 in cui la reina esterifica il 10% dei gruppi alcolici dell'acido ialuronico.
6. Sale sodico di un estere secondo le rivendicazioni da 1 a 4.
7. Estere o sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 in cui la reina è in forma di diacetilreina.
8. Procedimento per la preparazione di un estere ialuronil-reinato o di un suo sale secondo le rivendicazioni da 1 a 7 comprendente la reazione del cloruro acido della reina con l'acido ialuronico.
9. Procedimento secondo la rivendicazione 8 in cui il cloruro acido della reina e l'acido ialuronico sono in quantità tali da ottenere un rapporto percentuale tra le mmol di cloruro acido della reina ed i meq delle unità alcoliche esterificabili dell'acido ialuronico e almeno del 5%.
10. Procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui detto rapporto percentuale è compreso tra 5% e il 50%.
11. Procedimento secondo la rivendicazione 10 in cui detto rapporto



percentuale è compreso tra 5% e il 20%.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 11 in cui detto rapporto percentuale è del 10%.

13. Procedimento secondo le rivendicazioni da 8 a 12 comprendente i seguenti stadi:

- a) si prepara una sospensione di acido ialuronico in un solvente apolare aprotico;
- b) si aggiungono il cloruro acido di reina disciolto nella minima quantità di un solvente apolare aprotico e un accettore di ioni idrogeno;
- c) si lascia sotto agitazione a riflusso per un tempo sufficiente allo svolgersi della reazione di esterificazione; e
- d) si evapora il solvente.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 13 in cui detto solvente apolare aprotico dello stadio a) è cicloesano.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 13 in cui nello stadio b) detto accettore di ioni idrogeno è  $\text{NEt}_3$ .

16. Procedimento secondo le rivendicazioni da 13 a 15 in cui nello stadio c) la reazione viene lasciata a riflusso per almeno 20 ore.

17. Procedimento secondo le rivendicazioni da 8 a 16 in cui il cloruro acido della reina è ottenuto attraverso un procedimento comprendente i seguenti stadi:

- a') si prepara una sospensione di reina in un solvente apolare aprotico;
- b') si aggiunge una quantità di  $\text{SOCl}_2$  tale da ottenere un rapporto



molare tra  $\text{SOCl}_2$  e reina superiore a 10;

c') si lascia la reazione sotto agitazione a riflusso in atmosfera inerte per un tempo sufficiente alla formazione del cloruro acido della reina;

e

d') si allontanano il solvente e l'eccesso di  $\text{SOCl}_2$  non reagito per distillazione.

18.Procedimento secondo la rivendicazione 17 in cui detto solvente apolare aprotico dello stadio a') è un solvente clorurato.

19.Procedimento secondo la rivendicazione 18 in cui detto solvente clorurato è  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

20.Procedimento secondo le rivendicazioni da 17 a 19 in cui nello stadio c') la reazione viene lasciata a riflusso per almeno 3 ore.

21.Procedimento secondo le rivendicazioni da 8 a 20 comprendente inoltre uno stadio finale di purificazione.

22.Procedimento secondo la rivendicazione 21 in cui detto stadio di purificazione viene eseguito tramite l'utilizzo di una membrana da dialisi.

23.Composizione farmaceutica comprendente un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 7 in associazione con adatti eccipienti e /o diluenti.

24.Composizione secondo la rivendicazione 23 avente una formulazione adatta alla somministrazione loco-regionale.

25.Composizione secondo la rivendicazione 24 adatta alla somministrazione per infiltrazione intraarticolare.

26. Composizione secondo la rivendicazione 24 adatta alla somministrazione oftalmica.

27. Composizione secondo la rivendicazione 24 adatta alla somministrazione topica.

28. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 7 per la preparazione di un medicamento per la terapia di patologie infiammatorie.

29. Uso secondo la rivendicazione 28 in cui dette patologie infiammatorie sono patologie infiammatorie delle articolazioni.

30. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 7 per la preparazione di un medicamento per la riparazione tessutale, in cui detto tessuto è cartilagine o pelle.

31. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 7 per la preparazione di biomateriali.

(MAU/pd)

Milano, 26 Febbraio 2004

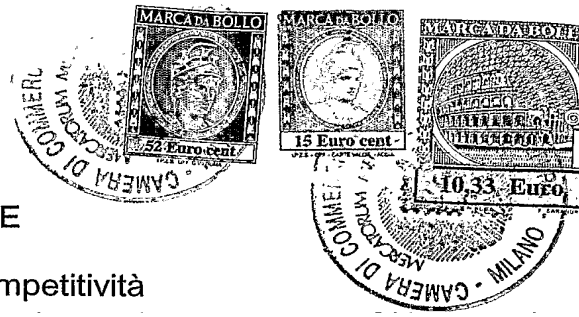
p. PHARMA MEDICAL LIMITED

Il Mandatario

  
Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.





MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

Direzione Generale per lo sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi – Ufficio G8

\* \* \* \* \*

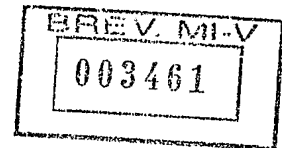
Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

“NUOVO FARMACO DA ASSOCIAZIONE “

a nome di: PHARMA MEDICAL LIMITED

con sede in: LONDRA/GB

depositata il 26.02.2004 con il No. MI2004A000347



\* \* \* \* \*

ISTANZA DI CORREZIONE ED INTEGRAZIONE

In base all'art. 49 del D.P.R. 22 Giugno 1979, N. 338, la sottoscritta PHARMA MEDICAL LIMITED, di nazionalità inglese, con sede a LONDRA/GB, a mezzo Mandatario Dr. Diego Pallini (albo n. 484) della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A., C.so di Porta Vittoria, 9 - Milano, presso cui ha eletto domicilio a tutti gli effetti di legge, chiede che venga concesso di apportare le seguenti correzioni.

A causa di un errore di battitura, a pagina 2 della descrizione è stato indicato in modo errato il nome del secondo inventore **TRAVAGLI Walter**.

Il nome esatto è **TRAVAGLI Valter**.

ELENCO POSTILLE

**POSTILLA 1** – Pagina 2 della descrizione, riga 9 dopo la parola “ialuronico” inserire “(HA)”.

**POSTILLA 2** – Pagina 2 della descrizione, ultima riga dopo la parola “acido” radiare “D-glucoronico” e inserire “D-glucuronico”.



**POSTILLA 3** – Pagina 3 della descrizione, riga 11 dopo la parola “alla” radiare “su” ed inserire “sua”.

**POSTILLA 4** – Pagina 4 della descrizione, riga 15 dopo il numero “5” inserire il simbolo “%”.

**POSTILLA 5** – Pagina 4 della descrizione, riga 16 dopo il numero “5” inserire il simbolo “%”.

**POSTILLA 6** – Pagina 4 della descrizione, riga 19 dopo la parola “esteri” radiare “ialuronoil-reinati” e inserire “ialuronil-reinati”.

**POSTILLA 7** – Pagina 5 della descrizione inizio riga, inserire “Il procedimento scelto ha tenuto nella debita considerazione la scelta dei solventi in funzione della accettabilità dei loro residui (ICH- International Conference of Harmonisation of technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)”

**POSTILLA 8** – Pagina 6 della descrizione, dopo la riga 5 inserire “Come già discusso più sopra l'estere ialuronil-reinato della presente invenzione presenta stabilità elevata, essendo stabile per almeno 24 mesi ad una temperatura di  $4^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  in soluzione acquosa, preferibilmente tamponata a pH 7.4, come ad esempio un tampone fosfato soluzione salina preparato secondo la Farmacopea Ufficiale Italiana XI Ed.”

**POSTILLA 9** – Pagina 6 della descrizione, riga 6 dopo la parola “Esteri” radiare “ialuronilreinato” e inserire “ ialuronil-reinato ”.

**POSTILLA 10** – Pagina 6 della descrizione, riga 11 dopo la parola “diluenti.” inserire “In particolare, le suddette composizioni possono essere dispositivi medici e/o medicinali per uso umano e veterinario.”

**POSTILLA 11** - Pagina 6 della descrizione, dopo la riga 16 inserire

“Preferibilmente, le composizioni dell'invenzione sono in forma di dispersione acquosa. Preferibilmente detta dispersione è in una soluzione tampone avente pH pari a 7.4, ad esempio una soluzione salina tampone fosfato preparata secondo la Farmacopea Ufficiale Italiana XI ed.

Secondo una applicazione particolarmente preferita, nelle suddette composizioni l'estere ialuronil-reinato è presente in concentrazione compresa tra lo 0.5% e il 2% p/v, più preferibilmente in concentrazioni pari all'1% p/v.”

**POSTILLA 12** – Pagina 7 della descrizione, radiare riga 4 e inserire “di seguito indicati.”

**POSTILLA 13** – Pagina 9 della descrizione, radiare riga 9 e inserire “della reina.”

**POSTILLA 14** – Pagina 9 della descrizione, riga 11 dopo il simbolo “%” inserire il punto e radiare “e il rapporto percentuale tra le mmol di cloruro acido della reina ed i meq delle unità alcoliche esterificabili dell'acido ialuronico è risultato superiore al 5%, come indicato nella descrizione sopra riportata.”

**POSTILLA 15** – Pagina 9 della descrizione, riga 23 dopo la parola “reina” radiare “dall'estere” e inserire “dal ialuronil-reinato”.

**POSTILLA 16** – Pagina 10 della descrizione, riga 6 dopo la parola “saponificazione” radiare “dell'estere” e inserire “del ”.

**POSTILLA 17** – Pagina 10 della descrizione, radiare la riga 17 e inserire “*Valutazione delle caratteristiche tecnologiche del prodotto*

1) *Valutazione della stabilità idrolitica*”

**POSTILLA 18** – Pagina 10 della descrizione, riga 18 radiare la parola “L'estere” e inserire l'articolo “Lo”.

**POSTILLA 19** – Pagina 10 della descrizione, ultima riga dopo la parola “che” inserire “, allo stato secco,”.

**POSTILLA 20** – Pagina 11 della descrizione, seconda riga radiare “L'estere” e inserire “Inoltre, lo”.

**POSTILLA 21** – Pagina 11 della descrizione, riga 3 radiare la parola “invece”.

**POSTILLA 22** – Pagina 11 della descrizione, radiare riga 14 e inserire “con le attuali tecniche analitiche. Pertanto, anche in soluzione, non è stata evidenziata alcuna degradazione idrolitica”.

I risultati ottenuti permettono di affermare che lo ialuronil-reinato è stabile per almeno 24 mesi in frigorifero (a  $4^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) in soluzione acquosa. Tale affermazione deriva dalla assenza di degradazione idrolitica apprezzabile per via

Inoltre, al fine di escludere che si verifichi degradazione idrolitica dell'acido ialuronico durante la reazione di esterificazione con reina si è effettuata una prova in bianco della reazione stessa. In particolare si sono realizzate le stesse condizioni della reazione di legame della reina all'acido ialuronico, ma in assenza di quest'ultima: 100 mg di acido ialuronico sono stati introdotti in 10 ml di ciloesano, 1 ml di diclorometano e 1 ml di trietilamina; la reazione è stata messa a riflusso ( $70^{\circ}\text{C}$ ) in atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ) per 24 ore; trascorso questo tempo sono stati eliminati sotto atmosfera di azoto i solventi di reazione.

Il composto ottenuto risulta molto meno solubile in acqua dell'acido ialuronico allo stato nativo ed è caratterizzato da una viscosità non determinabile dopo 24 ore di dispersione. Tale fatto ci porta ad escludere la depolimerizzazione che avrebbe comportato una solubilizzazione in acqua e pertanto una diminuzione della viscosità.

Infine è stata verificata la stabilità idrolitica dello ialuronil reinato purificato dell'Esempio 3 alla sterilizzazione. Infatti come discusso più sopra, si è osservato che l'utilizzo di materiale non sterile e il mancato impiego di conservanti porta alla presenza corpi estranei nei campioni di ialuronil-reinato.

E' stata preparata una soluzione all'1% di ialuronil-reinato, purificato con membrana da dialisi, in un tampone fosfato soluzione salina pH 7.4.

Pur consapevoli delle evidenze sperimentali che indicano l'acido ialuronico come molecola termo-sensibile (Biomaterials 23 (2002) 4503-4513) il campione, così ottenuto, è stato sterilizzato con vapore saturo sotto pressione in autoclave per 20 minuti a 121°C.

Il campione è stato quindi nuovamente dializzato in membrana da dialisi per valutare l'eventuale presenza della reina nel liquido dializzato: nessuna traccia di reina è stata rilevata. Questi risultati portano a concludere che il campione è idroliticamente stabile alla sterilizzazione al calore umido.

2) Analisi delle caratteristiche reologiche e della siringabilità.

E' stata analizzata la siringabilità dell'estere ialuronil reinato a confronto con quella dell'acido ialuronico sia ad alto che a basso peso molecolare.

In particolare sono stati preparati i seguenti tre campioni:



- a) soluzione all'1% p/v di acido ialuronico ad alto peso molecolare (peso molecolare medio di circa 1.200.000) in tampone fosfato soluzione salina pH 7.4
- b) soluzione all'1% p/v di acido ialuronico a basso peso molecolare (peso molecolare medio di circa 600.000) in tampone fosfato soluzione salina pH 7.4
- c) una soluzione all'1% p/v di ialuronil-reinato in tampone fosfato soluzione salina pH 7.4.

La viscosità dei campioni è stata quindi misurata con VISCOMATE MODEL VM-10A, ottenendo i seguenti valori:

- a)  $\eta = 78.4 \text{ mPa} \blacklozenge \text{s}$
- b)  $\eta = 64.8 \text{ mPa} \blacklozenge \text{s}$
- c)  $\eta = 47.9 \text{ mPa} \blacklozenge \text{s}$

I risultati ottenuti mostrano che lo ialuronil-reinato presenta una migliore siringabilità rispetto all'acido ialuronico allo stato nativo sia ad alto che a basso peso molecolare. Infatti, una soluzione all'1% p/v di ialuronil-reinato mostra una viscosità minore di quella di una soluzione all'1% p/v di acido ialuronico a basso peso molecolare, che a sua volta ha viscosità minore di una soluzione all'1% p/v di acido ialuronico ad alto peso molecolare.

La diminuzione di viscosità osservata, avendo dimostrato la mancanza di alcuna reazione di depolimerizzazione dell'acido ialuronico a seguito della reazione di esterificazione è imputabile all'interazione covalente della reina con l'acido ialuronico."

**POSTILLA 23** – Pagina 12 delle rivendicazioni, dopo la riga 13 radiare le rivendicazioni dalla 7 alla 27 e inserire



"7. Procedimento per la preparazione di un estere ialuronil-reinato o di un suo sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 comprendente la reazione del cloruro acido della reina con l'acido ialuronico

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7 in cui il cloruro acido della reina e l'acido ialuronico sono in quantità tali da ottenere un rapporto percentuale tra le mmol di cloruro acido della reina ed i meq delle unità alcoliche esterificabili dell'acido ialuronico almeno del 5%.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8 in cui detto rapporto percentuale è compreso tra 5% e il 50%.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui detto rapporto percentuale è compreso tra 5% e il 20%.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 10 in cui detto rapporto percentuale è del 10%.

12. Procedimento secondo le rivendicazioni da 7 a 11 comprendente i seguenti stadi:

- a) si prepara una sospensione di acido ialuronico in un solvente apolare aprotico;
- b) si aggiungono il cloruro acido di reina disciolto nella minima quantità di un solvente apolare aprotico e un accettore di ioni idrogeno;
- c) si lascia sotto agitazione a riflusso per un tempo sufficiente allo svolgersi della reazione di esterificazione; e
- d) si evapora il solvente.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 12 in cui detto solvente apolare aprotico dello stadio a) è cicloesano.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 12 o 13 in cui nello stadio b) detto accettore di ioni idrogeno è  $\text{NEt}_3$ .

15. Procedimento secondo le rivendicazioni da 12 a 14 in cui nello stadio c) la reazione viene lasciata a riflusso per almeno 20 ore.

16. Procedimento secondo le rivendicazioni da 7 a 15 in cui il cloruro acido della reina è ottenuto attraverso un procedimento comprendente i seguenti stadi:

a') si prepara una sospensione di reina in un solvente apolare aprotico;

b') si aggiunge una quantità di  $\text{SOCl}_2$  tale da ottenere un rapporto molare tra  $\text{SOCl}_2$  e reina superiore a 10;

c') si lascia la reazione sotto agitazione a riflusso in atmosfera inerte per un tempo sufficiente alla formazione del cloruro acido della reina; e

d') si allontanano il solvente e l'eccesso di  $\text{SOCl}_2$  non reagito per distillazione.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 16 in cui detto solvente apolare aprotico dello stadio a') è un solvente clorurato.

18. Procedimento secondo la rivendicazione 17 in cui detto solvente clorurato è  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

19. Procedimento secondo le rivendicazioni da 16 a 18 in cui nello stadio c') la reazione viene lasciata a riflusso per almeno 3 ore.

20. Procedimento secondo le rivendicazioni da 7 a 19 comprendente inoltre uno stadio finale di purificazione.

21. Procedimento secondo la rivendicazione 20 in cui detto stadio di purificazione viene eseguito tramite l'utilizzo di una membrana da dialisi.

22. Composizione farmaceutica comprendente un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 in associazione con adatti eccipienti e /o diluenti.

23. Composizione secondo la rivendicazione 22 avente una formulazione adatta alla somministrazione loco-regionale.

24. Composizione secondo la rivendicazione 23 adatta alla somministrazione per infiltrazione intraarticolare.

25. Composizione secondo la rivendicazione 23 adatta alla somministrazione oftalmica.

26. Composizione secondo la rivendicazione 23 adatta alla somministrazione topica.”

**POSTILLA 24** – Pagina 15 delle rivendicazioni, dopo la riga 4 inserire

“27. Composizione secondo le rivendicazioni da 22 a 26 in forma di dispersione acquosa.

28. Composizione secondo la rivendicazione 27 in cui detta dispersione è in una soluzione tampone avente pH pari a 7.4.

29. Composizione secondo le rivendicazioni 27 o 28 in cui l'estere ialuronil-reinato è in concentrazione compresa tra lo 0.1% e il 2% p/v .

30. Composizione secondo la rivendicazione 29 in cui l'estere ialuronil-reinato è in concentrazione pari all'1% p/v.

31. Medicinale per uso umano o animale costituito da una composizione secondo le rivendicazioni da 22 a 30.

32. Dispositivo medico per uso umano o veterinario costituito da una composizione secondo le rivendicazioni da 22 a 30.”



**POSTILLA 25** – Pagina 15 delle rivendicazioni, radiare dalla rivendicazione 28 alla rivendicazione 31 e inserire “33. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 per la preparazione di un medicamento per la terapia di patologie infiammatorie.

34. Uso secondo la rivendicazione 33 in cui dette patologie infiammatorie sono patologie infiammatorie delle articolazioni.

35. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 per la preparazione di un medicamento per la riparazione tessutale, in cui detto tessuto è cartilagine o pelle.

36. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 per la preparazione di biomateriali.”

(MAU/As)

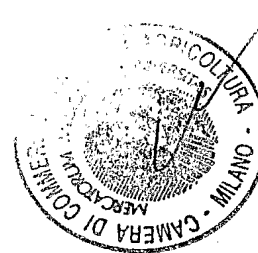
Milano, 1 Dicembre 2004

p. PHARMA MEDICAL LIMITED

il Mandatario

Dr. Diego Pallini

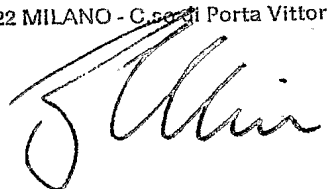
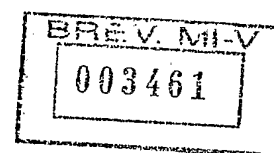
NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



ALLEGATO A

Rettifica alla descrizione della domanda di Brevetto N. MI2004A000347  
del 26.02.2004 contenuta in n. 25 Postille richieste con istanza  
depositata

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.  
20122 MILANO - C.so di Porta Vittoria, 9

A handwritten signature in black ink, appearing to read "G. Bartolo", is written over the printed name of the notary.

## ELENCO POSTILLE

**POSTILLA 1** – Pagina 2 della descrizione, riga 9 dopo la parola “ialuronico” inserire “(HA)”.

**POSTILLA 2** – Pagina 2 della descrizione, ultima riga dopo la parola “acido” radiare “D-glucoronico” e inserire “D-glucuronico”.

**POSTILLA 3** – Pagina 3 della descrizione, riga 11 dopo la parola “alla” radiare “su” ed inserire “sua”.

**POSTILLA 4** – Pagina 4 della descrizione, riga 15 dopo il numero “5” inserire il simbolo “%”.

**POSTILLA 5** – Pagina 4 della descrizione, riga 16 dopo il numero “5” inserire il simbolo “%”.

**POSTILLA 6** – Pagina 4 della descrizione, riga 19 dopo la parola “esteri” radiare “ialuronoil-reinati” e inserire “ialuronil-reinati”.

**POSTILLA 7** – Pagina 5 della descrizione inizio riga, inserire “Il procedimento scelto ha tenuto nella debita considerazione la scelta dei solventi in funzione della accettabilità dei loro residui (ICH- International Conference of Harmonisation of technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)”

**POSTILLA 8** – Pagina 6 della descrizione, dopo la riga 5 inserire “Come già discusso più sopra l'estere ialuronil-reinato della presente invenzione presenta stabilità elevata, essendo stabile per almeno 24 mesi ad una temperatura di  $4^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  in soluzione acquosa, preferibilmente tamponata a pH 7.4, come ad esempio un tampone fosfato soluzione salina preparato secondo la Farmacopea Ufficiale Italiana XI Ed.”

**POSTILLA 9** – Pagina 6 della descrizione, riga 6 dopo la parola “Estere” radiare “ialuronilreinato” e inserire “ ialuronil-reinato ”.

**POSTILLA 10** – Pagina 6 della descrizione, riga 11 dopo la parola “diluenti.” inserire “In particolare, le suddette composizioni possono essere dispositivi medici e/o medicinali per uso umano e veterinario.”

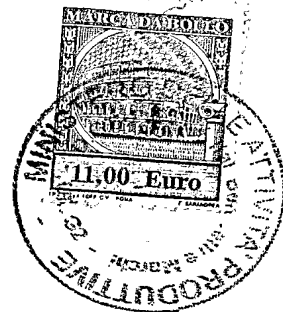
**POSTILLA 11** - Pagina 6 della descrizione, dopo la riga 16 inserire “Preferibilmente, le composizioni dell’invenzione sono in forma di dispersione acquosa. Preferibilmente detta dispersione è in una soluzione tampone avente pH pari a 7.4, ad esempio una soluzione salina tampone fosfato preparata secondo la Farmacopea Ufficiale Italiana XI ed.

Secondo una applicazione particolarmente preferita, nelle suddette composizioni l'estere ialuronil-reinato è presente in concentrazione compresa tra lo 0.5% e il 2% p/v, più preferibilmente in concentrazioni pari all'1% p/v.”

**POSTILLA 12** – Pagina 7 della descrizione, radiare riga 4 e inserire “di seguito indicati.”

**POSTILLA 13** – Pagina 9 della descrizione, radiare riga 9 e inserire “della reina.”

**POSTILLA 14** – Pagina 9 della descrizione, riga 11 dopo il simbolo “%” inserire il punto e radiare “e il rapporto percentuale tra le mmol di cloruro acido della reina ed i meq delle unità alcoliche esterificabili dell'acido ialuronico è risultato superiore al 5%, come indicato nella descrizione sopra riportata.”



**POSTILLA 15** – Pagina 9 della descrizione, riga 23 dopo la parola “reina” radiare “dall’estere” e inserire “dal ialuronil-reinato”.

**POSTILLA 16** – Pagina 10 della descrizione, riga 6 dopo la parola “saponificazione” radiare “dell’estere” e inserire “del ”.

**POSTILLA 17** – Pagina 10 della descrizione, radiare la riga 17 e inserire **“Valutazione delle caratteristiche tecnologiche del prodotto**

*1) Valutazione della stabilità idrolitica”*

**POSTILLA 18** – Pagina 10 della descrizione, riga 18 radiare la parola “L’estere” e inserire l’articolo “Lo”.

**POSTILLA 19** – Pagina 10 della descrizione, ultima riga dopo la parola “che” inserire “, allo stato secco,”.

**POSTILLA 20** – Pagina 11 della descrizione, seconda riga radiare “L’estere” e inserire “Inoltre, lo”.

**POSTILLA 21** – Pagina 11 della descrizione, riga 3 radiare la parola “invece”.

**POSTILLA 22** – Pagina 11 della descrizione, radiare riga 14 e inserire “con le attuali tecniche analitiche. Pertanto, anche in soluzione, non è stata evidenziata alcuna degradazione idrolitica “.

I risultati ottenuti permettono di affermare che lo ialuronil-reinato è stabile per almeno 24 mesi in frigorifero (a  $4^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ) in soluzione acquosa. Tale affermazione deriva dalla assenza di degradazione idrolitica apprezzabile per via

Inoltre, al fine di escludere che si verifichi degradazione idrolitica dell’acido ialuronico durante la reazione di esterificazione con reina si è effettuata una prova in bianco della reazione stessa. In particolare si



sono realizzate le stesse condizioni della reazione di legame della reina all'acido ialuronico, ma in assenza di quest'ultima: 100 mg di acido ialuronico sono stati introdotti in 10 ml di cloroesano, 1 ml di diclorometano e 1 ml di trietilamina; la reazione è stata messa a riflusso (70°C) in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) per 24 ore; trascorso questo tempo sono stati eliminati sotto atmosfera di azoto i solventi di reazione.

Il composto ottenuto risulta molto meno solubile in acqua dell'acido ialuronico allo stato nativo ed è caratterizzato da una viscosità non determinabile dopo 24 ore di dispersione. Tale fatto ci porta ad escludere la depolimerizzazione che avrebbe comportato una solubilizzazione in acqua e pertanto una diminuzione della viscosità.

Infine è stata verificata la stabilità idrolitica dello ialuronil reinato purificato dell'Esempio 3 alla sterilizzazione. Infatti come discusso più sopra, si è osservato che l'utilizzo di materiale non sterile e il mancato impiego di conservanti porta alla presenza corpi estranei nei campioni di ialuroni-reinato.

E' stata preparata una soluzione all'1% di ialuronil-reinato, purificato con membrana da dialisi, in un tampone fosfato soluzione salina pH 7.4.

Pur consapevoli delle evidenze sperimentali che indicano l'acido ialuronico come molecola termo-sensibile (Biomaterials 23 (2002) 4503-4513) il campione, così ottenuto, è stato sterilizzato con vapore saturo sotto pressione in autoclave per 20 minuti a 121°C.

Il campione è stato quindi nuovamente dializzato in membrana da dialisi per valutare l'eventuale presenza della reina nel liquido dializzato: nessuna traccia di reina è stata rilevata. Questi risultati portano a

concludere che il campione è idroliticamente stabile alla sterilizzazione al calore umido.

## 2) Analisi delle caratteristiche reologiche e della siringabilità.

E' stata analizzata la siringabilità dell'estere ialuronil reinato a confronto con quella dell'acido ialuronico sia ad alto che a basso peso molecolare.

In particolare sono stati preparati i seguenti tre campioni:

- a) soluzione all'1% p/v di acido ialuronico ad alto peso molecolare (peso molecolare medio di circa 1.200.000) in tampone fosfato soluzione salina pH 7.4
- b) soluzione all'1% p/v di acido ialuronico a basso peso molecolare (peso molecolare medio di circa 600.000) in tampone fosfato soluzione salina pH 7.4
- c) una soluzione all'1% p/v di ialuronil-reinato in tampone fosfato soluzione salina pH 7.4.

La viscosità dei campioni è stata quindi misurata con VISCOMATE MODEL VM-10A, ottenendo i seguenti valori:

- a)  $\eta = 78.4 \text{ mPa} \blacklozenge \text{s}$
- b)  $\eta = 64.8 \text{ mPa} \blacklozenge \text{s}$
- c)  $\eta = 47.9 \text{ mPa} \blacklozenge \text{s}$

I risultati ottenuti mostrano che lo ialuronil-reinato presenta una migliore siringabilità rispetto all'acido ialuronico allo stato nativo sia ad alto che a basso peso molecolare. Infatti, una soluzione all'1% p/v di ialuronil-reinato mostra una viscosità minore di quella di una soluzione all'1% p/v di acido ialuronico a basso peso molecolare, che a sua volta ha viscosità

minore di una soluzione all'1% p/v di acido ialuronico ad alto peso molecolare.

La diminuzione di viscosità osservata, avendo dimostrato la mancanza di alcuna reazione di depolimerizzazione dell'acido ialuronico a seguito della reazione di esterificazione è imputabile all'interazione covalente della reina con l'acido ialuronico."

**POSTILLA 23** – Pagina 12 delle rivendicazioni, dopo la riga 13 radiare le rivendicazioni dalla 7 alla 27 e inserire

"7. Procedimento per la preparazione di un estere ialuronil-reinato o di un suo sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 comprendente la reazione del cloruro acido della reina con l'acido ialuronico

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7 in cui il cloruro acido della reina e l'acido ialuronico sono in quantità tali da ottenere un rapporto percentuale tra le mmol di cloruro acido della reina ed i meq delle unità alcoliche esterificabili dell'acido ialuronico almeno del 5%.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8 in cui detto rapporto percentuale è compreso tra 5% e il 50%.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui detto rapporto percentuale è compreso tra 5% e il 20%.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 10 in cui detto rapporto percentuale è del 10%.

12. Procedimento secondo le rivendicazioni da 7 a 11 comprendente i seguenti stadi:

a) si prepara una sospensione di acido ialuronico in un solvente apolare aprotico;

b) si aggiungono il cloruro acido di reina disciolto nella minima quantità di un solvente apolare aprotico e un accettore di ioni idrogeno;

c) si lascia sotto agitazione a riflusso per un tempo sufficiente allo svolgersi della reazione di esterificazione; e

d) si evapora il solvente.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 12 in cui detto solvente apolare aprotico dello stadio a) è cicloesano.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 12 o 13 in cui nello stadio b) detto accettore di ioni idrogeno è  $\text{NEt}_3$ .

15. Procedimento secondo le rivendicazioni da 12 a 14 in cui nello stadio c) la reazione viene lasciata a riflusso per almeno 20 ore.

16. Procedimento secondo le rivendicazioni da 7 a 15 in cui il cloruro acido della reina è ottenuto attraverso un procedimento comprendente i seguenti stadi:

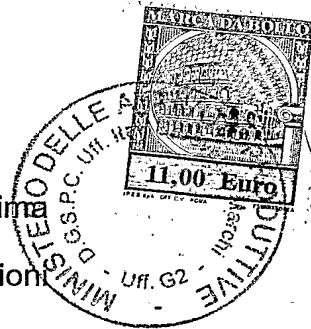
a') si prepara una sospensione di reina in un solvente apolare aprotico;

b') si aggiunge una quantità di  $\text{SOCl}_2$  tale da ottenere un rapporto molare tra  $\text{SOCl}_2$  e reina superiore a 10;

c') si lascia la reazione sotto agitazione a riflusso in atmosfera inerte per un tempo sufficiente alla formazione del cloruro acido della reina; e

d') si allontanano il solvente e l'eccesso di  $\text{SOCl}_2$  non reagito per distillazione.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 16 in cui detto solvente apolare aprotico dello stadio a') è un solvente clorurato.



18. Procedimento secondo la rivendicazione 17 in cui detto solvente clorurato è  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

19. Procedimento secondo le rivendicazioni da 16 a 18 in cui nello stadio c') la reazione viene lasciata a riflusso per almeno 3 ore.

20. Procedimento secondo le rivendicazioni da 7 a 19 comprendente inoltre uno stadio finale di purificazione.

21. Procedimento secondo la rivendicazione 20 in cui detto stadio di purificazione viene eseguito tramite l'utilizzo di una membrana da dialisi.

22. Composizione farmaceutica comprendente un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 in associazione con adatti eccipienti e /o diluenti.

23. Composizione secondo la rivendicazione 22 avente una formulazione adatta alla somministrazione loco-regionale.

24. Composizione secondo la rivendicazione 23 adatta alla somministrazione per infiltrazione intraarticolare.

25. Composizione secondo la rivendicazione 23 adatta alla somministrazione oftalmica.

26. Composizione secondo la rivendicazione 23 adatta alla somministrazione topica."

**POSTILLA 24** – Pagina 15 delle rivendicazioni, dopo la riga 4 inserire

"27. Composizione secondo le rivendicazioni da 22 a 26 in forma di dispersione acquosa.

28. Composizione secondo la rivendicazione 27 in cui detta dispersione è in una soluzione tampone avente pH pari a 7.4.

29. Composizione secondo le rivendicazioni 27 o 28 in cui l'estere ialuronil-reinato è in concentrazione compresa tra lo 0.1% e il 2% p/v .

30. Composizione secondo la rivendicazione 29 in cui l'estere ialuronil-reinato è in concentrazione pari all'1% p/v.

31. Medicinale per uso umano o animale costituito da una composizione secondo le rivendicazioni da 22 a 30.

32. Dispositivo medico per uso umano o veterinario costituito da una composizione secondo le rivendicazioni da 22 a 30."

**POSTILLA 25** – Pagina 15 delle rivendicazione, radiare dalla rivendicazione 28 alla rivendicazione 31 e inserire "33. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 per la preparazione di un medicamento per la terapia di patologie infiammatorie.

34. Uso secondo la rivendicazione 33 in cui dette patologie infiammatorie sono patologie infiammatorie delle articolazioni.

35. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 per la preparazione di un medicamento per la riparazione tessutale, in cui detto tessuto è cartilagine o pelle.

36. Uso di un estere o un sale secondo le rivendicazioni da 1 a 6 per la preparazione di biomateriali."



MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

Direzione Generale per lo sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi – Ufficio G2

\* \* \* \*

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"NUOVO FARMACO DA ASSOCIAZIONE"

a nome di: PHARMA MEDICAL LIMITED

con sede in: LONDRA/ GB

depositata il 26.02.2004 con il No. MI2004A000347

\* \* \* \* \*

ISTANZA DI CORREZIONE ED INTEGRAZIONE

In base all'art. 49 del D.P.R. 22 Giugno 1979, N. 338, la sottoscritta PHARMA MEDICAL LIMITED, con sede in LONDRA/GB di nazionalità inglese, a mezzo Mandatario Dr.ssa Gemma Gervasi (albo n. 238) della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A., C.so di Porta Vittoria, 9 - Milano, presso cui ha eletto domicilio a tutti gli effetti di legge, chiede che venga concesso di apportare la seguente correzione qui di seguito specificata.

**POSTILLA 1** – Dopo la pagina n. 15 delle RIVENDICAZIONI, alleghiamo n. 3 tavole da disegno.

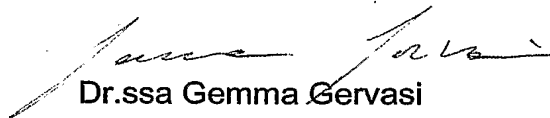
MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE D.G.S.P.C. - Off. Ital. Brevetti e Marchi Ufficio G2 - Ufficio Protocollo
24 FEB. 2005
10295

24.02.2005  
*Mish*

Roma 21 Febbraio 2005

p. PHARMA MEDICAL LIMITED

Il Mandatario

  
Dr.ssa Gemma Gervasi

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

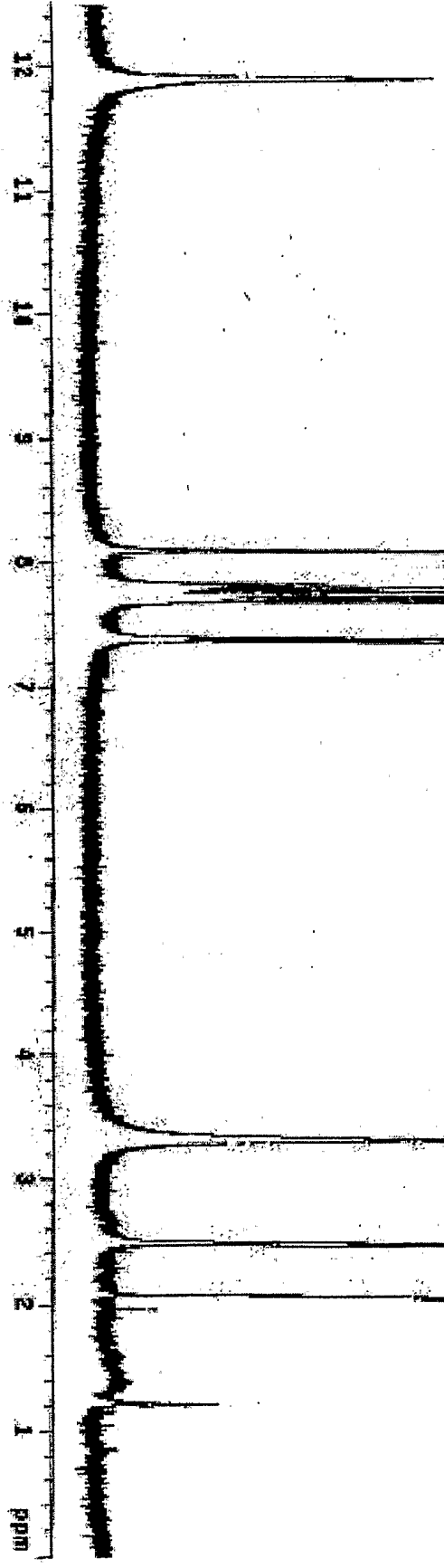


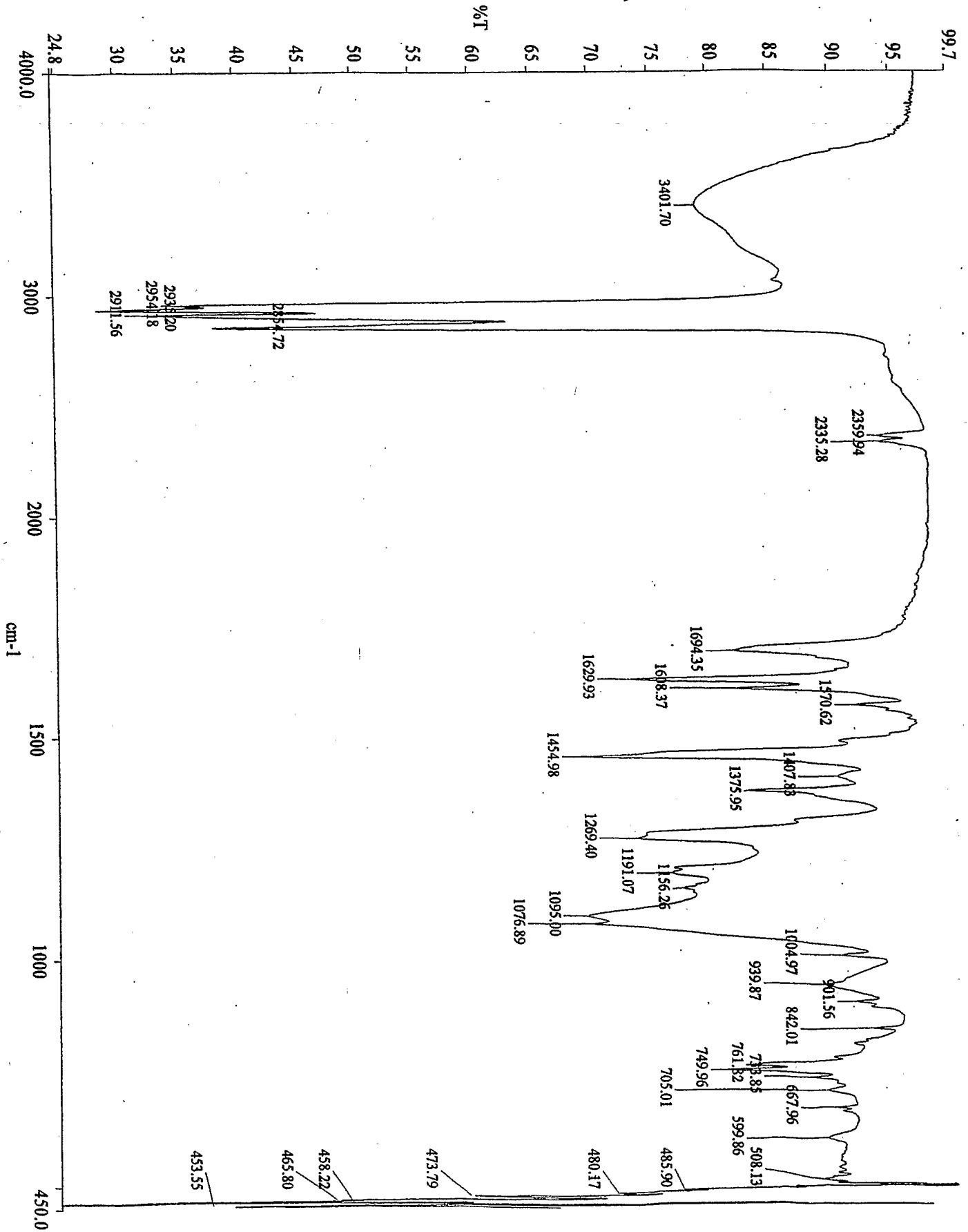


*per per*

STANDARD IN CHARGE

NAME: **STANDARD**  
 DATE: **2002-12-20**  
 TIME: **10:00**  
 ACQUISITION: **2002-12-20 10:00**  
 PROCESSING: **2002-12-20 10:00**  
 FILE: **2002-12-20 10:00**  
 F2: **2002-12-20 10:00**  
 F3: **2002-12-20 10:00**  
 F4: **2002-12-20 10:00**  
 F5: **2002-12-20 10:00**  
 F6: **2002-12-20 10:00**  
 F7: **2002-12-20 10:00**  
 F8: **2002-12-20 10:00**  
 F9: **2002-12-20 10:00**  
 F10: **2002-12-20 10:00**  
 F11: **2002-12-20 10:00**  
 F12: **2002-12-20 10:00**  
 F13: **2002-12-20 10:00**  
 F14: **2002-12-20 10:00**  
 F15: **2002-12-20 10:00**  
 F16: **2002-12-20 10:00**  
 F17: **2002-12-20 10:00**  
 F18: **2002-12-20 10:00**  
 F19: **2002-12-20 10:00**  
 F20: **2002-12-20 10:00**  
 F21: **2002-12-20 10:00**  
 F22: **2002-12-20 10:00**  
 F23: **2002-12-20 10:00**  
 F24: **2002-12-20 10:00**  
 F25: **2002-12-20 10:00**  
 F26: **2002-12-20 10:00**  
 F27: **2002-12-20 10:00**  
 F28: **2002-12-20 10:00**  
 F29: **2002-12-20 10:00**  
 F30: **2002-12-20 10:00**  
 F31: **2002-12-20 10:00**  
 F32: **2002-12-20 10:00**  
 F33: **2002-12-20 10:00**  
 F34: **2002-12-20 10:00**  
 F35: **2002-12-20 10:00**  
 F36: **2002-12-20 10:00**  
 F37: **2002-12-20 10:00**  
 F38: **2002-12-20 10:00**  
 F39: **2002-12-20 10:00**  
 F40: **2002-12-20 10:00**  
 F41: **2002-12-20 10:00**  
 F42: **2002-12-20 10:00**  
 F43: **2002-12-20 10:00**  
 F44: **2002-12-20 10:00**  
 F45: **2002-12-20 10:00**  
 F46: **2002-12-20 10:00**  
 F47: **2002-12-20 10:00**  
 F48: **2002-12-20 10:00**  
 F49: **2002-12-20 10:00**  
 F50: **2002-12-20 10:00**  
 F51: **2002-12-20 10:00**  
 F52: **2002-12-20 10:00**  
 F53: **2002-12-20 10:00**  
 F54: **2002-12-20 10:00**  
 F55: **2002-12-20 10:00**  
 F56: **2002-12-20 10:00**  
 F57: **2002-12-20 10:00**  
 F58: **2002-12-20 10:00**  
 F59: **2002-12-20 10:00**  
 F60: **2002-12-20 10:00**  
 F61: **2002-12-20 10:00**  
 F62: **2002-12-20 10:00**  
 F63: **2002-12-20 10:00**  
 F64: **2002-12-20 10:00**  
 F65: **2002-12-20 10:00**  
 F66: **2002-12-20 10:00**  
 F67: **2002-12-20 10:00**  
 F68: **2002-12-20 10:00**  
 F69: **2002-12-20 10:00**  
 F70: **2002-12-20 10:00**  
 F71: **2002-12-20 10:00**  
 F72: **2002-12-20 10:00**  
 F73: **2002-12-20 10:00**  
 F74: **2002-12-20 10:00**  
 F75: **2002-12-20 10:00**  
 F76: **2002-12-20 10:00**  
 F77: **2002-12-20 10:00**  
 F78: **2002-12-20 10:00**  
 F79: **2002-12-20 10:00**  
 F80: **2002-12-20 10:00**  
 F81: **2002-12-20 10:00**  
 F82: **2002-12-20 10:00**  
 F83: **2002-12-20 10:00**  
 F84: **2002-12-20 10:00**  
 F85: **2002-12-20 10:00**  
 F86: **2002-12-20 10:00**  
 F87: **2002-12-20 10:00**  
 F88: **2002-12-20 10:00**  
 F89: **2002-12-20 10:00**  
 F90: **2002-12-20 10:00**  
 F91: **2002-12-20 10:00**  
 F92: **2002-12-20 10:00**  
 F93: **2002-12-20 10:00**  
 F94: **2002-12-20 10:00**  
 F95: **2002-12-20 10:00**  
 F96: **2002-12-20 10:00**  
 F97: **2002-12-20 10:00**  
 F98: **2002-12-20 10:00**  
 F99: **2002-12-20 10:00**  
 F100: **2002-12-20 10:00**





*June 1991*

MS Spectrum

\*MSD1 SPC, time=3.504:3.654 of TRAVAGLIA25-09003.D API-ES, Pos, Scan, Frag: 70

